

神経発生におけるポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能

黒 坂 光
鳥 羽 慎 也

1. はじめに

我々は神経発生におけるムチン型糖鎖の役割について研究を行っている。ムチン型糖鎖は主にゴルジ体において、多くの糖転移酵素の連続的な作用により1つずつ糖が付加されて、糖鎖が合成される(Elhammer, Kezdy, *et al.*, 1999)。これらの糖転移酵素において、UDP-N-アセチルガラクトサミン：ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素(以降 N-アセチルガラクトサミン転移酵素と略)は、糖鎖合成の開始反応を触媒する酵素である。したがって、この酵素はポリペプチド鎖上の糖鎖の数と位置を決定する重要な役割を果たしている。ほ乳類のゲノムの塩基配列の解析から、N-アセチルガラクトサミン転移酵素は20種類以上の多くのアイソザイムからなることが報告されている。これらは組織分布および基質特異性などにおいて、互いに重複するものの特有の性質を持つことが知られている(Young, Holcomb, *et al.*, 2003)。このことから、それぞれの組織におけるムチン型糖鎖の発現様式は、各組織におけるアイソザイムの発現パターンによって決まると考えられる。以前に我々は、神経細胞にのみ特異的に発現するアイソザイム GalNAc-T9 をクローニングした(Toba, Tenno, *et al.*, 2000)。またその後、GalNAc-T9 と高い相同性を持つ新規遺伝子もクローニングした(Nakamura, Toba, *et al.*, 2005)。この新規遺伝子も、GalNAc-T9 と同様、神経系に特徴的な発現パターンを示した。我々はこの遺伝子産物を昆虫細胞中で発現させ、その酵素活性を測定したところ、ムチン様の合成ペプチドに対して弱いながらも糖を転移する活性を見いだしたので、この遺伝子を GalNAc-T16 と命名した。このように神経系に GalNAc-T9 や-T16 の様なアイソザイムが局在していることから、神経系に特有のムチン型糖鎖が存在し、神経系に特有の機能を付与している可能性が考えられる。本研究では、神経細胞への分化能を持つマウス胚性細胞株 P19 細胞を用いて、神経発生における N-アセチルガラクトサミン転移酵素、およびそれが合成するムチン型糖鎖の役割について調べた。

2. マウス胚性細胞株 P19 細胞の神経分化における N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

マウス胚性細胞株 P19 細胞は、多分化能を有する細胞であり、培地に添加する試薬により、異なる細胞へと分化することが知られている。この細胞にレチノイン酸を添加すると神経細胞へと分化する(Jones-Villeneuve, McBurney, *et al.*, 1982; Jones-Villeneuve, Rudnicki, *et al.*, 1983)。神経細胞に分化させるにはまず、P19 細胞にレチノイン酸を添加して2日間培養する。この細胞をトリプシン処

理し、ペトリ皿にてレチノイン酸存在下でさらに2日間培養すると、細胞はペトリ皿の中で凝集塊を形成する。この凝集塊の形成は、P19細胞の神経細胞への分化に不可欠な過程である。次に、この細胞凝集塊をトリプシン消化して分散し、培養皿に戻してレチノイン酸非存在下で2~4日培養すると、細胞は神経細胞へと分化し、神経突起を形成するなどの特徴的な形態を示すようになる。我々はまず、この神経発生における N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現様式を調べた(図1)。レチノイン酸未添加、凝集塊形成、および最終神経分化2日目、4日目におけるそれぞれのアイソザイムの発現を RT-PCR で調べた。その結果、神経系に特異的な3つのアイソザイム、すなわち GalNAc-T9、-T13、-T16、およびそれに加えて GalNAc-T14 の発現は、神経特異的マーカーである MAP2 と同様の発現パターンを示しており、神経発生に伴い発現していることがわかった。その他のアイソザイムは GalNAc-T2 を除いて、いずれも細胞の分化の状態と発現レベルは無関係であった。GalNAc-T2 については、発生のどの段階においても発現は認められなかった。

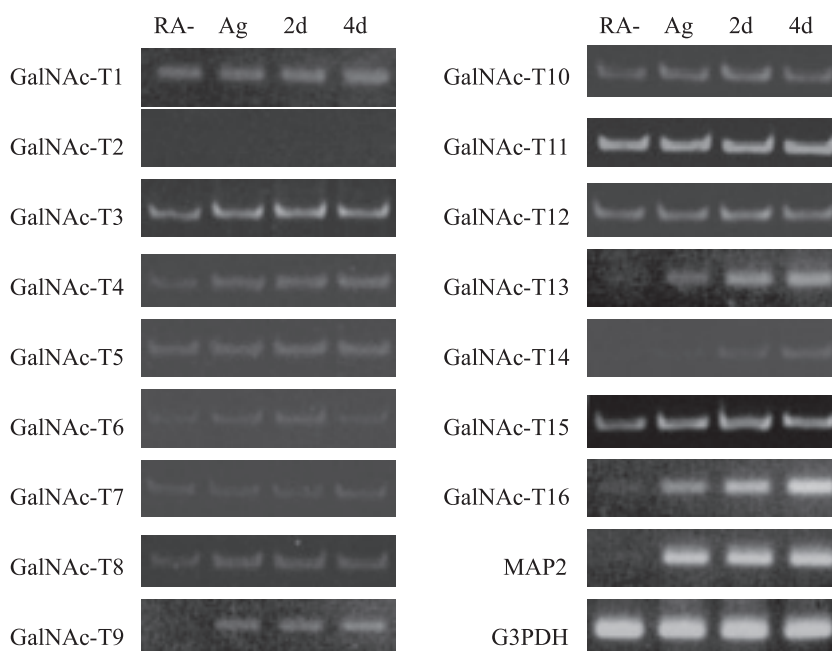


図1 P19細胞の神経分化とN-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

3. N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現抑制

P19細胞の神経発生とN-アセチルガラクトサミン転移酵素の関連を調べるために、RNAi法を用いて、GalNAc-T1、-T9、-T13、-T16のそれぞれのアイソザイムの発現を抑制した。P19細胞に各アイソザイムに対するアンチセンスRNAを発現させるためのプラスミドをトランスフェクションし、プラスミドを安定に保有する細胞を得た。図2ではそれぞれの細胞において、標的となるアイソザイムの発現が抑制されているかどうかをRT-PCR法により調べた。図2aでは、レチノイン酸添加後

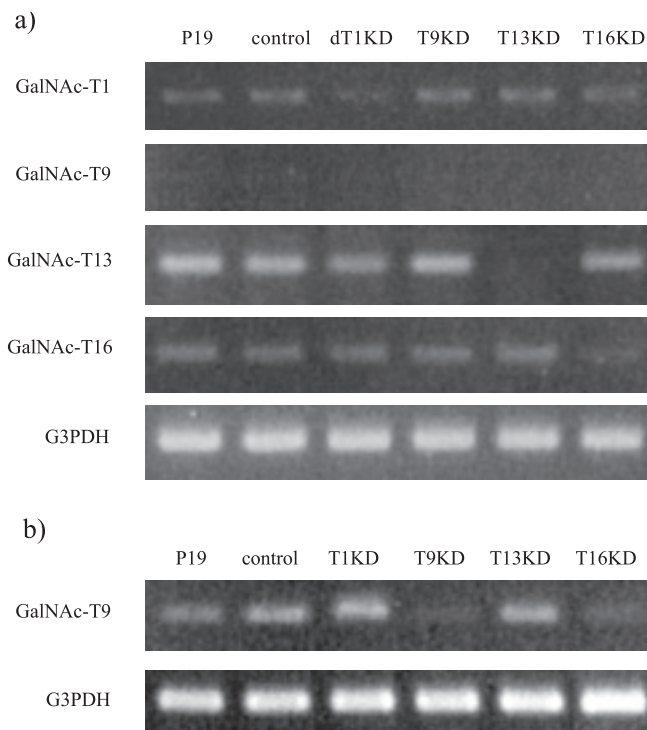


図2 N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現抑制

2日目の細胞から抽出したRNAから調製したcDNAを用いてPCRを行った。GalNAc-T1, -T13, -T16においては、それぞれ特異的に発現が抑制されていることがわかる。しかしながらGalNAc-T9については、レチノイン酸添加2日目では、酵素の発現が誘導されておらず、すべての細胞においてバンドを検出することができなかった。

そこで、GalNAc-T9については、凝集塊を形成した細胞からRNAを抽出してRT-PCRを行った(図2b)。その結果、GalNAc-T9の発現を抑制した細胞(T9KD)において顕著な発現抑制が見られた。またこのとき、GalNAc-T16のノックダウン細胞においても、GalNAc-T9の発現が抑制されている。GalNAc-T16の発現を抑制した細胞においては、細胞は後述するようにアポトーシスをおこし、神経発生しない。そのためT16KD細胞では、神経発生に伴い増加するGalNAc-T9の発現が見られなかったものと思われる。

4. GalNAc-T16とアポトーシス

P19細胞で上記4つのアイソザイムの発現を抑制したところ、GalNAc-T1, -T9, -T13の3つのアイソザイムについては、大きな変化は見られず正常な神経発生が見られた。ところがGalNAc-T16の発現を抑制した細胞(T16KD)においては、レチノイン酸を加えて神経誘導を開始すると、ほとんどの細胞が培養皿から遊離し始めた。培養皿に接着していた一部の細胞をペトリ皿に移して培養しても、

細胞はもはや凝集塊を形成することができず、その後の神経分化も見られなかった。

我々は、レチノイン酸添加後に、T16KD 細胞がアポトーシスを起こした可能性を考えて、細胞膜上でのホスファチジルセリンのトランスロケーションを調べた。一般に、アポトーシスを起こした細胞では細胞膜の非対称性が失われる。ホスファチジルセリンは通常は膜の細胞質側に多く存在するが、アポトーシスの初期の段階で、細胞の外側の膜にトランスロケーションされる(Koopman, Reutelingsperger, *et al.*, 1994)。ホスファチジルセリンのトランスロケーションは、ホスファチジルセリンに対して高い親和性を持つアネキシン V (AnV) の細胞表面への結合により調べることができる。また、死細胞を選択的に染色するヨウ化プロピジウム (PI) を用いて細胞を同時に染色することにより、AnV⁻PI⁻の正常細胞、AnV⁺PI⁻の初期アポトーシス細胞、AnV⁺PI⁺の後期アポトーシスおよびネクローシス細胞の割合がわかる。図3は AnV と PI で二重染色した細胞を FACS で分離したときの結果である。この結果から、T16KD では顕著に AnV⁺PI⁻の初期アポトーシス細胞の割合が増加していることがわかった。

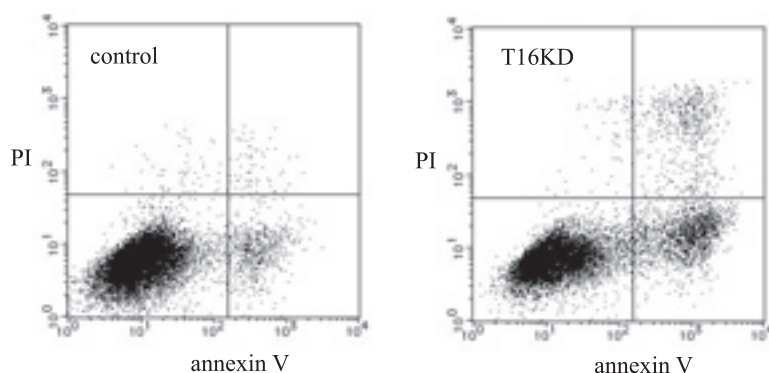


図3 GalNAc-T16 の発現抑制とアポトーシス

5. 最後に

N-アセチルガラクトサミン転移酵素には多くのアイソザイムが存在することから、ムチン型糖鎖はそれぞれの組織で特有の糖鎖が合成され、重要な機能を担っていると考えられている。しかし、アイソザイムの発現分布や基質特異性が重複していることなどが原因となって、それぞれのアイソザイムの機能は、まだほとんど解明されていない。このような状況をふまえて、我々は神経系におけるムチン型糖鎖の役割を、神経特異的な N-アセチルガラクトサミン転移酵素アイソザイムの機能解析を通じて明らかにすることを研究の目的としている。

本研究において、我々は神経細胞への分化能を持つ P19 細胞を用いて、神経系特異的なアイソザイムの機能解析を試みた。その結果、GalNAc-T16 が神経発生およびアポトーシスに関連して重要な働きをしていることを見いだした。P19 細胞においては、少なくとも GalNAc-T16 が発現していることが、レチノイン酸処理による神経分化には不可欠であることがわかった。我々は、GalNAc-T16

の発現抑制により、P19 細胞がアポトーシスに導かれることについての分子的な基盤を明らかにする予定である。また、同時に神経発生に関わる分子群の発現変動も解析中である。これらの解析を通じて、神経系におけるムチン型糖鎖の発生における機能およびアポトーシスとの関連が明らかになると思われる。

6. 引用文献

- Elhammer, A. P., Kezdy, F. J. and Kurosaka, A. (1999) The acceptor specificity of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycoconj. J.*, **16**, 171-180.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. and Kalnins, V. I. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.*, **94**, 253-262.
- Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F. and McBurney, M. W. (1983) Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2271-2279.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.
- Nakamura, N., Toba, S., Hirai, M., Morishita, S., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N. and Kurosaka, A. (2005) Cloning and expression of a brain-specific putative UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase gene. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 429-433.
- Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., Mikami, T., Itoh, N. and Kurosaka, A. (2000) Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochim. Biophys. Acta*, **1493**, 264-268.
- Young, W. W., Jr., Holcomb, D. R., Ten Hagen, K. G. and Tabak, L. A. (2003) Expression of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isoforms in murine tissues determined by real-time PCR : a new view of a large family. *Glycobiology*, **13**, 549-557.